

# 药物筛选技术的 最新进展——高内涵筛选

孙婉, 李敏 (北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

## 【作者简介】

孙婉 (1983 —), 女, 硕士研究生  
联系电话: (010)82801161  
E-mail:laura324@sohu.com

## 【通讯作者】

李敏 (1963 —), 女, 博士, 副研究员  
主要从事抗肿瘤和免疫调节剂药物筛选、筛选方法的建立以及相关药物作用机制的研究。  
联系电话: (010)82801161 Email:limin63@yahoo.com.cn

## 【关键词】药物筛选；创新药物；高内涵筛选；活性化合物

创新药物的发现离不开采用适当的药物作用靶点对大量化合物样品进行筛选, 而且筛选规模越大, 发现新药的机会就越多。目前, 高通量药物筛选 (HighThroughputScreening, HTS) 技术已经使采用适当的药物作用靶点对利用天然产物和组合化学生成的大量化合物样品进行筛选成为现实。然而, 新药研究领域目前仍面临许多严峻的挑战。传统的、针对单一靶点的研究方法已难以适应一些多基因疾病 (如肿瘤、神经退行性疾病、代谢性疾病) 和病毒感染等相关治疗药物的研究。而高内涵筛选 (High content screening, HCS) 技术的创立使得人们从疾病相关基因调控通路和网络水平上研究药物的作用机制、代谢途径和潜在毒性等, 也使在细胞水平全面评价活性化合物的成药性成为可能。现对 HCS 的概念、系统组成、在药物筛选中的优势及其应用进行简要综述。

## 1. HCS 的概念

1997 年, 美国 Cellomics 公司成功开发出首个 HCS 技术平台, 该技术的问世揭开了药物筛选研究崭新的一页。而后国外其他一些公司也相继开发出同类产品, 加入了 HCS 技术的研究。HCS 是指在保持细胞结构和功能完整性的前提下, 同时检测被筛样品对细胞形态、生长、分化、迁移、凋亡、代谢途径及信号转导各个环节的影

响, 在单一实验中获取大量与基因、蛋白及其他细胞成分相关的信息, 确定其生物活性和潜在毒性的过程。同时, HCS 也是一种应用高分辨率的荧光数码影像系统, 旨在获得被筛样品对细胞产生的多维立体和实时快速的生物效应信息, 在细胞水平上检测多个指标的多元化、功能性筛选技术平台。

## 2. HCS 的优势

通过与目前广泛使用的 HTS 技术进行比较, HCS 的优势可从多方面体现。相比传统的药理学实验方法, HTS 以其快速、高特异性、高灵敏度的特点在短短数年内, 就受到国际药物研究机构的极大重视, 成为新药发现过程中的主要技术手段。虽然其发现活性化合物的速度快, 但是其检测模型均建立在单个药物作用靶分子的基础上, 无法全面反映被筛样品的生物活性特征, 只得到有限的的数据, 初筛得到的阳性结果需要进一步确认。此外, HTS 是针对单个靶点筛选量的极大提高, 取得了纵向上的突破, 而 HCS 不仅在筛选量上超越了 HTS, 而且实现了对多个靶点的同时筛选, 拓展了检测范围, 即取得了纵向和横向上的双重突破。更重要的是, HCS 获取信息是以细胞为单位, 而不是像 HTS 是以微板孔为单位, 这就意味着研究者可以从细胞群体中的各种反应获取信息, 而不是像以前那样信息仅仅来源于一个微板孔中的所有细胞

的平均反应。HCS 这种获取多个终点, 包括单个和细胞群体的定量数据的能力全面加深了研究者对筛选中得到信息的理解, 这为过去劳动强度和难度均很大的细胞功能和作用机制研究提供了新颖的视角。

通过同步应用报告基因、荧光标记、酶学反应和细胞可视化等 HCS 常规检测技术, 研究人员可以在新药研究的早期阶段获得活性化合物对细胞产生的多重效应的详细数据, 包括细胞毒性、代谢调节和对其他靶点的非特异性作用等, 从而显著提高发现先导化合物的速率, 减少开发后期的失败率。虽然 HCS 作为一种在新药研发中应用的全新研究手段才仅仅几年, 但是国外业界人士一致评价 HCS 是新药研发的具有重要意义的重要组成部分, 如果说高通量自动化 DNA 测序技术对顺利完成人类基因组计划的贡献是革命性的, 那么 HCS 在当今药物发现中将起到同样的关键作用。

**[摘要]** 化合物活性筛选是创新药物研究过程的起点和具有决定意义的关键步骤。基于细胞的高内涵药物筛选技术实现了对化合物多靶点多参数的同时检测, 代表着创新药物研究技术发展的必然趋势, 将在未来的新药研发过程中发挥重要作用。笔者介绍了高内涵筛选技术的概念、系统组成, 分析了其优势特点, 并简要讨论了其在新药研究尤其是抗肿瘤药物研究中的应用。

### 3. HCS 系统的组成

HCS 系统是一个从活细胞中提取信息并建立系统化认识细胞形态或分子变化的综合体系。体系中各组成发挥不同的作用,并联合起来共同完成全面的筛选工作。主要包括以下几部分。

#### 3.1 荧光显微系统

由于许多化合物只能引起在细胞形态、细胞器形态和分子分布方面相对微弱的改变,高分辨率荧光显微镜成为检测这些变化的理想选择。该系统中,细胞结合荧光标记物可反映出细胞生理条件上的变化,并通过将光源引入到细胞内的荧光探针捕获到细胞变化的丰富图像信息。

#### 3.2 自动化荧光图像获取系统

在观察到荧光标记的细胞变化后,高分辨率 CCD 相机可用于拍摄图像。自动化荧光图像获取系统可快速并精确地移动细胞培养板或载玻片,自由转换各种波长的激光及散射滤光片以满足多种研究需要。同时使用激光共聚焦技术可以与多种培养板匹配,在较短时间内完成 96 孔板或 384 孔板样品分析。另外还可增加温度控制系统以维持细胞活性,也可增加自动加样系统以及白光系统等功能,便于灵活使用。

#### 3.3 检测仪器

观察并获取图像只是 HCS 技术的第一步,为了有效完成分析工作,必须利用检测仪器从图像中提取有价值的信息。为了拓展检测的范围,一些国外医药公司开发了应用工具来建立以变化终点检测和动态活细胞检测相结合为基础的分析方法。例如美国 Cellomics 公司开发出的 Arraysean HCS Reader 和 Kinetic Scan HCS Reader 等。

#### 3.4 图像处理分析软件

随着 HCS 的开发,需要一种新型的软件使 HCS 操作简化和自动化,有利于基于形态学和荧光标记的细胞特征和参数的测定。例如 Cellomics 公司开发的 BioApplication 软件,它可以在适合的环境下将图像数据转化为生物学信息,能够处理多种来源的图像和数据,包括来自荧光检测、激光共聚焦、扫描流式细胞检测以及其他 HCS 仪器的图像与数据。

#### 3.5 结果分析和数据管理系统

上述应用软件可用于分析单个和群体细胞水平的多种特征,追踪分析多种细胞变化过程,包括信号分子转位、受体内源化、钙离子化、酶活化、细胞凋亡、细胞周期以及神经突生长等,获取有意义的生物信息并转变为药物与细胞相互作用

的全面认识,加速新药的研发。数据管理系统用来储存和管理已获取的图像和定量分析结果,并能够将结果以显像、图表和数字等多种形式在个体细胞和细胞群体的水平输出,便于研究者回顾和总结这些信息以辅助其作出决策。

#### 3.6 其他

除上述这些主要组成外,生物信息学工具、新型细胞株的研制和选择性试剂也是 HCS 综合系统的组成部分,而且在实验检测中同样发挥着重要作用。基于上述组成的 HCS 系统按照一定的工作流程可广泛应用于新药研究的不同方面,见图 1。

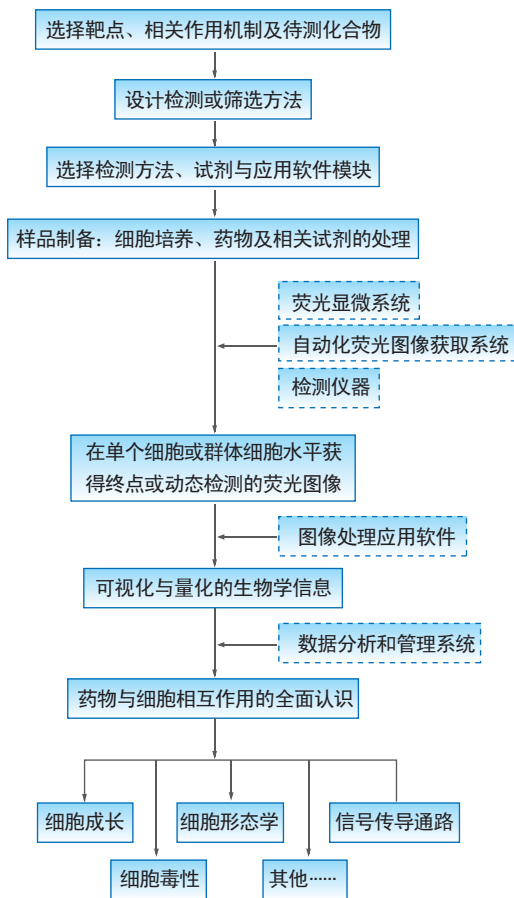


图1 HCS系统工作流程

## 4. HCS 的应用

作为药物筛选技术发展前沿的 HCS 已在新药研究的多个方面开始应用,并且随着 HCS 操作系统和应用工具的不断开发, HCS 已成为基于细胞的药物筛选靶点优化、二次筛选、先导化合物的确立以及药物结构与功能关系研究的重要技术手段。HCS 技术在实际应用中的巨大潜力已为研究者所认同,下面将从细胞生长、细胞与细胞器形态学变化、信号传导通路和细胞毒性等方面简述 HCS 的应用。

### 4.1 细胞生长

有关细胞增殖的分析研究在药物研发过程中,特别是在评价药物的药效与毒性方面意义重大。药物对有丝分裂、细胞周期及其相关调节通路的影响都可用 HCS 技术进行检测。

#### 4.1.1 有丝分裂

有丝分裂指数是指在一个细胞群体中经历分化过程的细胞比例,可用于研究细胞增殖过程中的每个生理或病理过程,例如免疫应答、炎症、组织内环境稳定性与血管生成等。细胞增殖包括多个复杂的亚细胞变化的精细调控过程,但其中 2 个关键的有丝分裂现象很容易辨别,即微管纺锤丝的形成和染色体的浓缩。利用识别核内组蛋白磷酸化抗原决定基的特异性抗体以及荧光标记的第二抗体可辨认处在有丝分裂过程中的细胞。有丝分裂指数可作为评价生长因子对细胞的刺激潜能以及药物抗增殖活性的指标之一,不仅可用于识别增殖细胞和筛选诱导或抑制有丝分裂过程的化合物,同时也可作为一种诊断方法发现癌细胞。研究表明,以 Arrayscan 为检测仪的 HCS 技术测定有丝分裂指数与荧光激活细胞分选 (FACS) 的效果相同,而且 HCS 使用 96 孔板,并可检测黏附细胞,使得样品制备过程更为简单。

#### 4.1.2 细胞周期

以往对细胞周期的研究中,由于处于有丝分裂和 G<sub>1</sub> 细胞是非荧光标记的,所以分辨进入 G<sub>1</sub> 和 S 期的细胞就很困难。但采用 HCS 系统的细胞增殖荧光检测方法,通过引入不同的标记物,处于周期中每一个位置的细胞均可得以分辨。例如, GFP-G2M 细胞周期标记细胞株稳定表达 GFP 融合蛋白可示踪 CyclinB1 表达和降解动力学,可以在非破坏性和线性条件下观察与定位活细胞所处的周期位置。在相同细胞群中用几个不同的标记物同时进行分析也有助于发现特异的细胞周期不同时期的阻断剂。

#### 4.1.3 调节通路

细胞的增殖反应也会引起多个通路的激活,应用新颖的细胞增殖 HCS 分析方法可同时检测属于不同通路的生物标记物。Gasparri 等建立了 HCS 自动多参数分析法测定正常人体真皮成纤维细胞 (normal human dermal fibroblast, NHDF) 的体外增殖指数。他们用胰岛素样生长因子、血小板来源的生长因子、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子或血清饥饿的 NHDF,测定 Ki-67 抗原表达、BrdU

(bromodeoxyuridine) 掺入和 pRb (retinoblastoma protein) 磷酸化来定量检测增殖指数。这一方法的突出优点在于每种增殖标记物可单独分析也可与其他标记物结合起来综合分析。

### 4.2 细胞形态学

#### 4.2.1 细胞运动

细胞的运动特性影响细胞的很多生理和病理学过程,包括癌细胞的侵袭与转移、炎症、血管形成、创伤修复和胚胎发育等。用 HCS 直接测定迁移细胞产生的运动轨迹可分析细胞的运动能力。实验在铺满标记荧光珠子的毯状结构上进行,随着细胞移动,它们会吞噬珠子,并在所到之处留下动态轨迹,故轨迹面积与细胞运动能力大小是成比例的。

#### 4.2.2 细胞伸展性

细胞识别并结合固定的配体,进而吸附于组织特异性的底物上,由于受体配体的相互作用,细胞伸长变平。这种细胞伸展的过程受细胞表面的黏附分子和细胞外基质的调节。HCS 系统检测细胞伸展性并不是测定细胞-配体结合力的持久与否,而是通过测定特异底物的吸附和伸展,来反映细胞的应答能力,这种测定提供了一个对细胞形态学变化所需要的调节和结构分子进行功能性检测的方法。那些以这些分子的功能和表达为靶点的药物的有效性可通过测定细胞在组织特异性底物上吸附和伸展的频率得到分析。

#### 4.2.3 神经生长

在中枢神经系统药物研发中,识别作用于神经突生长的化合物成为研究的核心内容。但是现有的检测方法有劳动强度大、主观性强、无法准确区别神经细胞本身和它的轴突等缺点。而 HCS 技术可利用对神经细胞特异性的荧光标记抗体识别神经细胞,并且用不同颜色的荧光区分神经细胞和其轴突,由此取代了以往从不同类型细胞的混合体中分离神经细胞这一非常耗时的步骤,使得检测工作的速度大大提高,并且降低了人为误差。Nakashima 利用抗微管蛋白的特异抗体和 Alex. Fluor488 标记的二抗体识别 PC12 细胞 (大鼠嗜铬细胞瘤细胞) 神经突,检测神经生长。还有人用 PC12 细胞的亚克隆 Neuroscreen-1 细胞,进行同类实验。Neuroscreen-1 细胞比 PC12 细胞生长快 50%—80%,而且对于神经生长因子有更灵敏和更快的反



应性, 在 2d 内可测量到轴突长度的变化, 而不是往常的  $6 - sd$ 。所以这种细胞更适用于更高通量的筛选。

### 4.3 信号传导通路的研究

以体内某些与疾病密切相关的信号分子为靶点来研究药物作用机制或筛选化合物是新药研究的重要内容之一。绝大部分信号分子的激活与其在细胞内的转移有密切关系, 所以 HCS 系统可通过测定信号分子的转移来间接检测传导通路上的信号激活。

NF-KB 与肿瘤和炎症的发生都有密切关系, 是目前研究较多的信号分子之一。Ding 等利用 HCS 技术测定 IL-1 和 TNF 诱导的 NF-KB 核转移。HCS 系统作为快速、敏感和自动化定量检测体系可用于监测 NF-KB 信号传导过程中的早期事件, 并可用于自动化筛选抑制或诱导 NF-KB 激活的化合物。

HCS 系统还可解决一些更复杂的关于信号传导的问题。不同的刺激物可激活不同的信号分子, 而一些分子会参与多个信号通路, 这种复杂性使确定特异受体或刺激物激活信号通路的过程成为富有挑战性的问题。例如, MAPK (mitogen-activated protein kinase) 信号通路及其激活的研究。MAPKs 的信号传递在很多信号传导通路中扮演重要角色, 并且是抗肿瘤药物研究中的关键靶点。ERKs (extracellular signal-regulated protein kinases) 是 MAPKs 的一种。阐明特异受体激活 ERK 的过程可识别特异作用于此通路的化合物。Ghosh 等用 HCS 分析了表皮生长因子 (EGF) 受体特异激活 ERK 的过程。ERK 结合并激活受体可导致 2 个效应, 即 ERK 磷酸化并转移至核内及 EGF 受体-配体复合物内源化并在核内体 (endosome) 与溶酶体中降解。用 HCS 可以同时检测、确认和联系这 2 个平行过程, 显示出基于细胞的 HCS 分析方法具有同时测定多个靶点以及追踪动态变化过程的能力。该实验中, 采用了 3 种荧光标记物检测 3 个不同的靶点 (蓝色荧光标记细胞核、绿色荧光标记 ERK 和红色荧光标记 EGF), 而 HCS 应用工具的灵活性还允许更多相关靶点 (最多至 6 个) 被同时定量检测, 为实际研究工作及基于 HCS 的自主研发提供了有利条件。自动化操作、完全客观、易于掌握的分析方法带来了丰富的信息和定量的结果, 并且显示出 HCS 在解决细胞内信号通路方面的巨大潜力。除此之外, 还有很多信号分子如 ATF-1, AKT1, c-Jun, NFAT, PKC $\alpha$ , STAT1, STAT2 和 STAT3 等可以用 HCS 来进行检测。

### 4.4 细胞毒性

药物研发过程中另一个必不可少的方面则是检测候选化合物的细胞毒性。HCS 系统中以多参数细胞毒性为基础的检测方法是应用混合荧光染料, 同时快速获取细胞毒性 4 个特性变化的有关信息, 即细胞核的形态学、细胞膜通透性、溶酶体内的物质和细胞密度。

自动化的 ArrayScanHCSReader 或标准荧光显微系统均可检测到分别被不同的细胞膜可透性荧光染料标记的死细胞与活细胞, 并且可以实现与其他参数 (如细胞毒性其他特征、信号传导通路、细胞器等) 的同步检测。

凋亡是在细胞生长与死亡中的重要过程, 凋亡过程受阻将会引起许多疾病。凋亡信号的模式大致相似, 但传导通路的细节会随着细胞种类和凋亡诱导物的变化而不同。HCS 系统提供了同时测定与凋亡相关的 3 个基础参数即核形态、线粒体质量或 / 和膜电位、f-肌动蛋白内容物改变的方法。Lovborg 等在实验中向 HeLa 细胞和淋巴瘤 U937 细胞加入细胞毒性药物, 孵育后再加入 DNA-结合染料 (Hoechst33342) 和荧光素标记探针。运用 HCS 的自动图像获取和分析工具, 在同一个细胞中可检测时间和剂量依赖性的 caspase-3 激活、线粒体膜电位增加和细胞核分裂或浓缩, 由此可筛选与评价具有诱导凋亡作用的新化合物。